Lane Medical Library

Aus dem Institut
für tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Universität Gießen
Direktor: Professor Dr. R. Standfuß.

Vergleichende Untersuchungen über den Nachweis des Coligehalts in der Milch

DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
Veterinär-medizinischen Fakultät der
Ludwigs-Universität zu Gießen

vorgelegt von

Harald Holtz

aus Osona (Südwest-Afrika)

Gießen 1937

Druck: von Münchowsche Universitäts-Druckerei Otto Kindt GmbH in Gießen

Gedruckt mit Genehmigung der Veterinär-medizinischen Fakultät zu Gießen.

Berichterstatter: Prof. Dr. Standfuß.

Prof. Dr. Beller.

Inhaltsübersicht.

I. Einleitung 5

II. Über die Bedeutung der Colizählung für die Milchuntersuchung 7

III. Nährböden 8

A. Agarnährböden 9

B. Flüssige Nährböden 10

IV. Schrifttum 13

V. Fragestellung der vorliegenden Arbeit 18

VI. Eigene Versuche und ihre Auswertung 19

VII. Zusammenfassung 27

VIII. Schrifttumverzeichnis 29

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154009_0337

I. Einleitung.

Die Rindermilch, eines der wertvollsten und billigsten Nahrungsmittel, behält nur dann ihren hohen Nährwert, wenn sie in einwandfreier Beschaffenheit zum Verbraucher gelangt. Um den Milchverbrauch zu steigern und die Bedenken, die dem Genuß roher Milch entgegenstehen, zu beseitigen, wäre die Gewinnung einer keimfreien Milch ein so ideales wie erstrebenswertes Ziel. Aber keimfrei ist eine Milch nie. Allerdings läßt sich der Bakteriengehalt bei sauberer Gewinnung und Behandlung in verhältnismäßig niedrigen Grenzen halten. Der Keimgehalt gilt als ein bedeutungsvoller Maßstab für die Güte der Milch, welche in demselben Maße abnimmt, wie die Bakterienzahl steigt. Für die Beurteilung der Milch vom hygienischen Standpunkt aus ist die Feststellung ihres Bakteriengehaltes besonders wichtig. Hierbei kommt es aber nicht nur auf die Gesamtkeimzahl an, sondern auch auf die Art der in der Milch vorhandenen Bakterien, insbesondere auf den Nachweis schädlicher Arten, von denen die wichtigsten die Coli-Aerogenes-Bakterien sind. Seitdem in den Ausführungsverordnungen zum Reichsmilchgesetz Grenzzahlen für den Coligehalt der Milch festgesetzt wurden, kommt der genauen quantitativen Bestimmung der Colibakterien nicht nur eine mehr wissenschaftliche Bedeutung zu. Die Frage, mit welchem Verfahren man die Anzahl der Colikeime einer Milch am zweckmäßigsten bestimmt, ist von praktischer Bedeutung geworden.

Für die bakteriologische Milchuntersuchung ist es immerhin bedeutungsvoll, sich darüber Klarheit zu verschaffen, welche Merkmale dem Bact. coli eigen sind. Die Bakterien der Coligruppe, die zu der großen Coli-Typhusgruppe gehören und zu den fakultativen Milchsäurebakterien zu rechnen sind, sind Darmbewohner. Das Bact. coli ist kein einheitlicher Typus. Zu ihm gehören eine große Zahl von Varietäten einer Bakterienart, die sowohl in morphologischer als auch in biologischer Beziehung nicht unerhebliche Unterschiede aufweisen. Das Vorkommen vieler Spielarten des Bact. coli gab den Anlaß, von einer „Coligruppe" zu sprechen.

Nach Spitta (10) werden von den meisten Autoren folgende Merkmale für Bact. coli als charakteristisch angesehen: Man

rechnet alle gramnegativ gefärbten, sporenlosen, schwach beweglichen oder unbeweglichen, Gelatine nicht verflüssigenden, Milchzucker und Traubenzucker vergärenden Mikroorganismen zur Gruppe des Bact. coli. Weiterhin bringt Bact. coli Milch zur Gerinnung, aus angedauter Trypsinbouillon bildet es Indol, Neutralrot wird von ihm zur gelbgrünen Fluorescenz gebracht und auf Endoagar wächst es in tiefroten glänzenden Kolonien. Mannit wird vergoren, dagegen bleibt Dulzit unverändert. Die Eigenschaft der Indolbildung kann jedoch fehlen. Nach Feststellungen von Dienert geht dem Bact. coli von allen Eigenschaften die Indolbildung zuerst verloren. Manche Coliarten vermögen auch Sacharose anzugreifen.

Die typischen Arten des Bact. coli haben sich insofern als chemisch sehr aktiv erwiesen, als sie mit Ausnahme des Dulzit die zur Artbestimmung der Bakterien der Coli-Typhusgruppe üblichsten Zuckerarten unter Säure- und Gasentwicklung zu zerlegen vermögen. Zur Trennung des normalen Bact. coli von anderen, diesem nahestehenden Arten hat sich am besten der Milchzucker bewährt. Die Prüfung auf die Zersetzungsfähigkeit der Colibakterien gegenüber einem Kohlehydrat erfolgt in der bekannten Weise, daß einem Agarnährboden ein Säureindikator zugegeben wird; die durch die Zersetzung des Kohlehydrats hervorgerufene Säurebildung zeigt sich durch einen Farbumschlag an, während die durch die Gärungsvorgänge auftretenden Gase in flüssigen Nährböden durch Hereinbringen von Gärungsröhrchen nachgewiesen werden können.

Die Bakterien der Coligruppe verhalten sich hinsichtlich der Schnelligkeit der Säure- und Gasbildung je nach Spielarten sehr verschieden. Einige Colirassen vermögen weder Säure noch Gas zu entwickeln. Nach Nissle (8) sind diese Bakterien, die aus Milchzucker keine Säure, d. h. auf Endoagar farblos wachsen, oder aus Traubenzucker kein Gas bilden, sonst aber mit den Eigenschaften des typischen Bact. coli übereinstimmen, als Paracolibakterien zu bezeichnen. Zu diesen Bakterien gehört auch das Bact. coli mutabile Neisser, das nur vorübergehend die Milchzuckervergärungsfähigkeit verliert.

Die zahlreichen und eingehenden Versuche, eine Gesetzmäßigkeit nach Beweglichkeit, Indol- und Phenolbildung und aus dem biochemischen Verhalten des Bact. coli gegenüber den Kohlehydraten und mehrwertigen Alkoholen zum Zwecke einer Gruppeneinteilung herauszufinden, haben wegen widersprechender Ergebnisse bisher keine allgemeine Anerkennung finden können.

Die Ursachen der Umwandlungen des Bact. coli sind nicht weiter bekannt. Nach Nissle sprechen die Erfahrungen dafür, daß die Umwandlungsformen der Colibakterien nicht als Mutationen, sondern als Modifikationen zu deuten sind.

Die Neigung des Bact. coli zur Variantenbildung kann das Urteil bei der Erkennung eines Colistammes schwierig machen. In der Regel ist das biochemische Verhalten jedoch meist so eindeutig, daß die Diagnose „Colibakterien" trotz der zahlreichen Spielarten keine größeren Schwierigkeiten zu bereiten pflegt.

II. Über die Bedeutung der Colizählung für die Milchuntersuchung.

Sieht man von dem bakteriologischen Nachweis von Krankheitserregern in einer Handelsmilch ab, so besteht die Hauptaufgabe der hygienischen Milchbakteriologie in der Überwachung des Verschmutzungsgrades. Heute wird allgemein das Bact. coli als Wertmesser für den Grad der Verunreinigung einer Milch angesehen, weil das Bact. coli das im Kot überwiegend vorkommende Darmbakterium ist. Das verbreitete Vorkommen von Colibakterien im Kot ist von Bedeutung, da sie Nahrungs- und Genußmittel verunreinigen. Die Gefahr der Verunreinigung ist gerade auf diesem Wege bei der Milch besonders groß, wodurch deren Geschmack, Haltbarkeit und Geruch nachteilig beeinflußt und deren Brauchbarkeit zur weiteren Verarbeitung auf Rahm, Butter und Käse unmöglich gemacht werden kann.

Die Bakterien der Coli-Aerogenes-Gruppe sind gefürchtete Molkereischädlinge. Niemeyer (1927) weist darauf hin, daß es trotz größter Sorgfalt niemals gelingt, den durch eine mit Coli-Aerogenes-Bakterien infizierte Milch angerichteten Schaden wieder gutzumachen. Alle Gegenmittel sind unzulänglich; die sicherste Vorbeugungsmaßnahme ist eine äußerst sorgfältige und reinliche Milchgewinnung.

Für die Beurteilung der Milch kommen weniger die Zahl der Mikroorganismen als die spezifischen Arten in Betracht. Nach Versuchen, die Barkworth, Mattik und Taylor (1927) durchführten, ist es unzulässig, die Haltbarkeit der Milch auf Grund bakteriologischer Zählung allein vorauszusagen. Sie würde zu unrichtigen Ergebnissen führen. Der Anzahl der Keime, selbst wenn sie anfänglich noch so klein ist, ist keine große Bedeutung beizumessen. Eine Milch z. B. mit 30000 Keimen in einem Kubikzentimeter, aber ohne Colibakterien, ist bedeutend mehr wert,

als eine Milch mit der geringen Keimzahl von 1000—5000 im Kubikzentimeter, in der sich Vertreter der Coligruppe befinden.

Normalerweise werden sich in einer einwandfrei gewonnenen Milch höchstens kleine Mengen von Bact. coli befinden. Daher wird z. B. an Vorzugsmilch nach § 38 (2) der Preußischen Verordnung zur Durchführung des Milchgesetzes vom 16. 12. 1931 die Anforderung gestellt, daß sie nicht mehr als 30 Colibakterien in einem Kubikzentimeter enthalten darf. Verschmutzte Milch kann schon in 0,1 ccm viele hundert und mehr Colibakterien enthalten. Eine getrennte Bestimmung der beweglichen Coliarten und der unbeweglichen Aerogenesbakterien ist unnötig, weil jene hauptsächlich durch den Kot, diese durch Schmutz und Staub in die Milch gelangen und beide Arten die Milch und ihre Erzeugnisse schädigen können. Mitunter lassen sich beide Keimarten nicht unterscheiden, weshalb man sie unter dem Namen „Coli-Aerogenes-Bakterien" zusammenzufassen pflegt.

Die Frage, ob und wie weit der Coligehalt durch die Jahreszeiten beeinflußt wird, ist durch Versuche von Malcolm geklärt worden. Malcolm (1934) untersuchte im Laufe eines ganzen Jahres den Coligehalt der Milch, den er in Beziehung setzte zum gesamten Keimgehalt. Der Verfasser fand, daß der Colititer in erster Linie beeinflußt wurde von der Temperatur, der die Milch nach ihrer Gewinnung ausgesetzt wurde. In den Sommermonaten während der größten Hitze war sowohl der Keimgehalt der Milch als auch der Coligehalt am höchsten. Der Anteil der Bakterien der Coligruppe zum Gesamtkeimgehalt betrug 96%. Der niedrigste Keimgehalt mit 25% Colibakterien wurde im Monat November gefunden. Sowohl im Sommer als auch im Winter nahm das Bact. coli, verglichen mit dem Gesamtkeimgehalt, von allen Bakterienarten der Milchflora, den höchsten Prozentsatz ein.

Pospesch (1934) fand ähnliche Ergebnisse; nach seinen Untersuchungen unterliegen die Colizahlen je nach Jahreszeit großen Schwankungen. Die Keimzahl in der Milch nimmt im Winter deutlich ab.

III. Nährböden.

Die zahlreichen, im Schrifttum angegebenen Verfahren zum Nachweis der Colibakterien in der Milch sind durch geeignete Zusätze so abgestimmt worden, daß sie das Wachstum gewisser Mikroorganismen begünstigen und deren Anwesenheit durch bestimmte, dabei auftretende Veränderungen erkennen lassen. Damit ist die Möglichkeit gegeben, die Bakterien einer Art ge-

trennt zu bestimmen. Verschiedene Nährböden haben nun besonders zum Nachweis von Colibakterien Geltung erlangen können. Man kann sagen, daß die Praxis zwei Wege einschlägt:

1. Die Aussaat auf feste Nährböden und Zählung der aus einer bestimmten Milchmenge aufgegangenen Colikolonien,
2. Die Aussaat abgestufter Mengen Milch in flüssige Nährböden und Feststellung der Grenze des Coliwachstums.

Aus der großen Anzahl der für diesen Zweck in Vorschlag gebrachten und angewandten Nährböden sind folgende in dieser Arbeit zur Prüfung stehenden benutzt worden:

A. Agarnährböden.

Zu den Versuchen mit Agarnährböden wurden fünf verschiedene Agarsorten herangezogen:

1. Fuchsin-Lactose-Agar nach Endo
2. Wasserblau-Metachromgelb-Agar nach Gaßner
3. Lackmus-Lactose-Agar nach Conradi-Drigalski
4. Lactose-Bromthymolblau-Trypaflavin-Agar nach Klimmer, Haupt und Borchers (6)
5. Neutralrot-Agar von Rothberger und Scheffler, abgeändert von Oldekop.

Endo-, Gaßner- und Conradi-Drigalski-Agar wurden in der üblichen Zusammensetzung verwendet.

Infolge der Säurebildung aus Milchzucker wächst Bact. coli auf Endo- und Drigalski-Nährböden rot. Kolonien, welche auf dem Endo'schen Fuchsinagar keinen Metallglanz zeigen, gehören gewöhnlich dem echten Bact. coli nicht an.

Die grüne Farbe des Metachromgelb-Wasserblau-Dreifarben-Nährbodens von Gaßner wird durch Kolonien des Bact. coli in tiefblau verwandelt. Bei Plattendurchsicht sind diese undurchsichtig blauschwarz.

Nach Anweisung von Spitta (10) enthält der Neutralrotagar: 10 g Pepton, 5 g Liebigs Fleischextrakt, 2,5 g Kochsalz, 500 ccm dest. Wasser. Auf pH 7,6 einstellen. Nach einstündigem Kochen setzt man dem Filtrat 0,3% Stangenagar zu. Nach abermaligem Kochen und Filtrieren erhalten je 100 ccm des Filtrats 1 ccm einer frisch bereiteten, konzentrierten Neutralrotlösung und 0,15 g Traubenzucker, in Reagenzgläser abfüllen und 1 Stunde entkeimen. Dieser Nährboden wird zur Anlage von Schüttelkulturen benutzt. Man gibt die Milch in Verdünnungen im Duplikat in die Röhrchen. Der Nachweis von Colibakterien erfolgt

durch den Umschlag des Neutralrots in kanariengelb mit grünlicher Fluorescenz. Der Farbumschlag beruht auf dem Übergang des Neutralrots zur alkalischen Seite.

Zur Bestimmung des Colititers in der Milch wurde zur Durchführung der Milchkontrolle folgende amtliche Vorschrift unter Anhang zu Anlage 2 des Rd. Erl. des Ru Pr MdI vom 23. Dezember 1935 Vet. 5110/35 erlassen:

„X. Bestimmung des Colititers

Lactose-Bromthymolblau-Trypaflavin-Agarplatte.

Herstellung: Fleischextrakt (Liebig) 3 g, Pepton (Witte) 5 g werden in 1000 ccm Wasser gelöst, mit 25 g Agar gekocht, filtriert, mit 10 ccm einer 1,5 prozentigen alkoholischen Lösung von Bromthymolblau versetzt und auf pH 6,8 (grasgrüne Farbe) eingestellt; dann werden 10 g Lactose in Nährboden gelöst.

Diesen Agar füllt man zweckmäßiger Weise in Fläschchen oder Kölbchen zu 100 ccm ab. Vor der Verwendung ist auf 100 ccm flüssig gemachten Agar 0,5 ccm einer 1 prozentigen wässerigen Trypaflavinlösung (in braunen Flaschen aufzubewahren) zuzusetzen. Colibakterien säuern stark und rufen daher gelbe Kolonien bzw. eine Gelbfärbung des Nährbodens hervor. Das Trypaflavin dient zur Wachstumshemmung anderer Begleitbakterien.

Ausführung des Verfahrens.

0,1 ccm der zu untersuchenden Milch ist mit einer geeichten Pipette direkt auf den gut getrockneten Nährboden zu verbringen und mit dem Drigalskispatel auszustreichen. Bebrütungsdauer 18 Stunden."

Als Platten wurden die bekannten Petrischalen von dem gewöhnlichen Durchmesser von 10 cm benutzt. Einheitlich geschah die Ausführung in der Weise, daß 0,1 ccm der Versuchsmilch gleichmäßig auf der erstarrten Agaroberfläche ausgestrichen wurde. Die Auszählung der gewachsenen Kolonien erfolgte nach eintägiger Bebrütungszeit.

B. Flüssige Nährböden.

Die Eigenschaft des Colibakteriums in zuckerhaltigen Nährböden neben der Bildung von Säure auch Gas zu entwickeln, ist bei der Auswahl der flüssigen Nährmedien das Entscheidende gewesen. Gasbildung ist auf Bact. coli zu beziehen, da der

Milchzucker im flüssigen Nährboden von den gramfesten Milchbakterien nur unter Säurebildung, nicht unter Gasbildung, vergoren wird. Im Grunde wechseln nur die den Nährböden zugesetzten Farbstoffe, die die Entwicklung unerwünschter grampositiver Keimarten hemmen, während durch andere Zusätze, z. B. Galle, wieder ein besonders günstiges Nährmedium für Bact. coli geschaffen wird, das diesem über den ungünstigen Einfluß des Farbstoffes hinweghilft. In die mit der Nährflüssigkeit beschickten Reagenzgläser werden Gärröhrchen umgekehrt eingestellt. Durch wiederholtes 10 bis 15 Minuten langes Sterilisieren wird die in den Gärröhrchen befindliche Luft herausgetrieben. Die Feststellung der Colibakterien erfolgt durch Überimpfen fallender Mengen Milch in die Nährböden und Ablesen der in den Gärröhrchen auftretenden Luftblasen.

Zu den Versuchen wurden nach dem Zehntelungsverfahren drei Verdünnungsgrade, nämlich 0,1 ccm, 0,01 ccm und 0,001 ccm der auf ihren Coligehalt zu prüfenden Milch gewählt. Bei den letzten Versuchen wurden die Nährböden auch mit 1,0 ccm der Versuchsmilch beschickt. Von jeder Verdünnung wurden zwei Röhrchen beimpft. Nach mindestens 48stündiger Bebrütung bei 37° C wurde festgestellt, bis zu welchem Verdünnungsgrad noch eine Gasbildung zu beobachten war. Gasansammlung in dem mit 0,1 ccm Milch beimpften Röhrchen sagt, daß höchstens 10, in dem mit 0,01 ccm Milch beimpften über 10, aber höchstens 100 Colibakterien usf. in je 1 ccm Milch enthalten sind.

Im folgenden werden zunächst die Verdünnungsverfahren zum Gasbildungsnachweis aus Milchzucker besprochen:

Es wurden folgende erfolgversprechende Nährböden verwendet:

1. Milchzuckerbouillon.

   Herstellung: 1000 ccm Fleischbrühe erhalten 10 g Milchzucker.

   Die Milchzuckerbouillon wurde als Kontrollnährboden benutzt, da sie, jeder Hemmstoffe bar, am besten geeignet sein muß, einen Vergleich mit den übrigen farbstoffhaltigen, also bakterien- bzw. colihemmenden Nährböden zuzulassen.

2. Trypaflavin-Milchzucker-Bouillon

   nach Klimmer, Haupt und Borchers (6).

   Ihre Zusammensetzung ist folgende: 10 g Liebigs Fleischextrakt, 10 g Pepton (Witte), 5 g Kochsalz, 10 g Milchzucker, 1000 ccm Wasser. Auf pH 7,2 einstellen. Vor dem Gebrauch

erhält die Stammlösung 1 ccm einer 1 %igen wässerigen Trypaflavinlösung.

3. Gentianaviolett-Pepton-Galle-Lactose-Bouillon von Kessler und Swenarton (4).

Nach der von den beiden Verfassern angegebenen Vorschrift wurde die Nährbouillon wie folgt hergestellt: 1000 ccm dest. Wasser, 50 g Rindergalle und 10 g Pepton werden 45 Minuten gekocht, dann werden darin 10 g Milchzucker gelöst. pH 7,8. (Mit Natronlauge und Phenolphtalein die Reaktion so einstellen, daß eine schwache Rotfärbung eintritt.) Dem Filtrat werden 4 ccm einer 1 %igen Gentianaviolettlösung zugesetzt.

4. Milchzucker-Galle-Bromthymolblau-Fuchsin-Bouillon nach Zavagli (12).

Herstellung: 1000 ccm kochendem Aqua dest. werden 10 g Pepton und 20 ccm Galle zugefügt. Nach 1stündigem Kochen setzt man 10 g Lactose und 1 ccm gesättigte, alkoholische Fuchsinlösung zu und entfärbt mit 20 ccm einer 10 %igen Natrium-Sulfit-Lösung. Die Lösung erhält noch 10 ccm einer alkoholischen 0,80 %igen Bromthymolblaulösung. pH 7,2.

5. Milchzucker-Galle-Bromthymolblau-Malachitgrün-Bouillon nach Zavagli (12).

Zusammensetzung: 1000 ccm kochendes dest. Wasser erhalten 10 g Pepton und 20 ccm Galle. Man fügt nach 1stündigem Kochen 10 g Lactose, 1 ccm einer 2 %igen Lösung von Malachitgrün, 10 ccm einer 0,80 %igen alkoholischen Bromthymolblaulösung hinzu und bringt auf pH 7,2.

6. Fuchsinbouillon nach Stern.

Herstellung: 20 g Pepton, 10 g Fleischextrakt und 5 g Kochsalz werden mit 1000 ccm Wasser gelöst und auf pH 7,8 bis 8,0 eingestellt, gekocht, filtriert und sterilisiert. Je 100 ccm dieser Stammlösung erhalten 5–6 Tropfen einer gesättigten, alkoholischen, filtrierten Lösung von basischem Fuchsin, 2 ccm frisch bereitete 10 %ige Natrium-Sulfit-Lösung,

1 ccm 0,25%ige wässerige Chrysoidinlösung und je 0,5 g Milch- und Rohrzucker.

Diese Methode gründet sich auf die Säurebildung der Bouillon mit Fuchsin als Indikator und Chrysoidin als Hemmungsmittel.

Die Fuchsinbouillon ist goldgelb. In der Wärme erhält sie eine rote Farbe. Bact. coli bedingt Rötung und Trübung der Bouillon.

7. Trypsin-Bouillon für die Indolprobe nach Neisser-Pringsheim.

Die Herstellung geschah nach folgendem Rezept: Zu 1000 ccm Fleischextraktbouillon, 10 g Pepton Witte und 5—10 g Fleischextrakt Liebig enthaltend, auf pH 7,6 eingestellt, werden 35—40° C warm in gut verschließbarer Glasstopfenflasche 0,2 g Trypsin Grübler und 10 ccm Chloroform zugesetzt und 24 Stunden bei 37° C angedaut. 1 Teil der fertigen Trypsinbouillon wird mit 3 Teilen physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. In Röhrchen abfüllen und sterilisieren. Die Lösung ist wasserhell.

Die Methode beruht auf der Tatsache, daß Colibakterien beim Eiweißabbau Indol bilden. Die Milch erfährt mehrere Verdünnungen, bis die letzten von ihnen nur noch eine oder gar keine Colibakterie enthalten. Schon nach 24 Stunden kann man 5—10 Tropfen Ehrlichs Reagenz in der Modifikation nach Pringsheim (5,0 Para-Dimethylamidobenzolaldehyd, 50 ccm Methylalkohol, 40 ccm Acid. hydrochloricum (chemisch rein)) zugeben. Tritt in einem Röhrchen rote Färbung ein, so kann man annehmen, daß in der rot gefärbten Nährbouillon gerade ein Colibakterium enthalten ist. Bei $^1/_{100}$ Verdünnung in diesem Röhrchen würde 1 ccm der Milch gerade 100 Colibakterien enthalten. Mit der Indolreaktion werden nur die echten indolbildenden Stämme erfaßt.

IV. Schrifttum.

Zur Bestimmung der Coli-Aerogenes-Bakterien in Milchen weisen Klimmer, Haupt und Borchers (1926) auf ein brauchbares Untersuchungsverfahren hin, das einen guten Einblick in die Sauberkeit bei der Milchgewinnung gewährt, auch wenn Milch schon durch Filtration von den sichtbaren Kotpartikelchen befreit wurde. Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal des Bact.

coli von den anderen Mikroorganismen aus der Gruppe der milchsäurebildenden, grampositiven Stäbchen ist die Vergärung von Milchzucker unter Gas- und Säurebildung. Um alle gramfesten Keimarten, unter denen sich besonders die milchzuckervergärenden Kokken als sehr störend erwiesen haben, in ihrem Wachstum zu hemmen, ohne gleichzeitig die Entwicklung der Coli-Aerogenes-Bakterien ungünstig zu beeinflussen, führten die Verfasser den Lactose-Bromthymolblau-Trypaflavin-Agar-Nährboden und die Trypaflavin-Lactose-Bouillon ein. Aus ihren Versuchen ging hervor, daß milchzuckerenthaltende feste und flüssige Nährböden zum Nachweis von Colibakterien sehr gut geeignet sind, wenn sie einen die gramfesten Keimarten in ihrem Wachstum hemmenden, die Ertwicklung der Coli-Aerogenesarten nicht ungünstig beeinflussenden Stoff enthalten. Als bakterienhemmende Substanz benutzten die Autoren den Farbstoff Trypaflavin. Die große Sicherheit, mit der die Begleitbakterien auf dem Trypaflavinagar in ihrem Wachstum gehemmt wurden, konnte mit der Tatsache bewiesen werden, daß grampositive Bakterien, die in den der Milch zugesetzten Kotaufschwemmungen vorwiegend vorhanden waren (die zu prüfenden Milchproben enthielten an Stelle der Coli-Reinkulturen Kot von Rindern), auf dem Trypaflavinagar nicht wuchsen. Zur Erprobung ihrer Nährböden haben die Verfasser in mehreren Versuchsreihen mit Bact. coli infizierte Milch und Kochsalzlösungen untersucht. Gleiche Werte wurden sowohl in Milch wie in Kochsalzaufschwemmung gefunden. Die drei Autoren kamen zu dem Ergebnis, daß es durch einen Zusatz von Trypaflavin in einer Dichte von 1:20000 zu festen und 1:100000 zu flüssigen Milchzuckernährböden gelingt, das Wachstum grampositiver Bakterien zu hemmen, während die Entwicklung der Keime aus der Coli-Aerogenes-Gruppe nicht unterdrückt wird.

Rühmekorf (1931) ist der Ansicht, daß sich zum Nachweis der Colibakterien die Trypaflavin-Lactose-Bouillon in der nach den Vorschriften angegebenen Trypaflavindichte bewährt habe und zur besseren Beurteilung der Milch mit heranzuziehen ist. Als Standardplattenzählmethode ist der Trypaflavinagar, allerdings mit einer Trypaflavinkonzentration 1:10000 zu benutzen.

Demeter, Sauer und Miller (2) haben von einer Anzahl Milchen jede Probe nach mehreren Methoden auf Coli-Aerogenesgehalt untersucht und zwar nach Plattenmethode, Gasbildungsnachweis in mehreren flüssigen Nährböden sowie Indolprobe. Zu den Versuchen mit festen Nährböden wurden drei verschiedene Agarsorten benutzt, nämlich: 1. Endoagar, 2. Try-

paflavinagar und 3. Trypaflavinagar mit Bromthymolblau. Von der Milch wurden Verdünnungsgrade hergestellt und von jedem Verdünnungsgrad zwei Platten gegossen bezw. ausgestrichen. Zum Nachweis der Gasbildung aus Milchzucker in Nährbouillon wurden verwendet: 1. Trypaflavinbouillon nach Klimmer, Haupt und Borchers, 2. Kristallviolettbouillon nach Selle und 3. Gentianaviolettbouillon nach Kessler und Swenarton. Die gefundenen Ergebnisse wurden nach der Methode des „gewogenen" Mittels und durch die Bestimmung des Rangkorrelationskoeffizienten ermittelt. Mit dem Gasbildungsnachweis in Kristallviolett und und mit dem Nachweis von Indol in Trypsinbouillon erhielt man die niedrigsten absoluten Durchschnittswerte. Die übrigen Gasnachweismethoden ergaben ebenfalls niedrigere Werte als die Plattenmethoden. Mit Endoagar wurden die höchsten Werte ermittelt. Mit dem Ausstreichverfahren der oben angegebenen festen Nährböden erzielte man höhere Keimzahlen als mit dem Gußverfahren. Wird vom Gasbildungsnachweis ganz abgesehen, dann wird von Demeter, Sauer und Miller die Gußmethode des Bromthymolblau-Lactose-Trypaflavin-Agar-Nährbodens nach Klimmer als am geeignetsten zur Colizählung empfohlen.

Sich stützend auf den überwiegenden Anteil an gramfesten Mikroorganismen in der Milchflora, haben Kessler und Swenarton (1927) für die Colibestimmung der Milch die spezifische Gentianaviolett-Pepton-Galle-Milchzuckerbouillon empfohlen. Nach ihren Untersuchungen über die Brauchbarkeit von Milchzuckerbouillon, Gentianaviolett-Milchzuckerbouillon und Gentianaviolett-Pepton-Galle-Milchzuckerbouillon ist das letztgenannte Nährsubstrat als das geeignetste zum Nachweis von Colibakterien in der Milch anzusehen. Der Farbstoff Gentianaviolett, in einer Dichte 1:25000 der Stammlösung zugesetzt, soll das Wachstum der grampositiven Begleitbakterien unterdrücken, während der Galle eine Schutzwirkung auf die Colikeime gegen den ungünstigen Einfluß des Farbstoffes zugedacht ist.

Zavagli (1933) hat zwei auf ähnlichen Voraussetzungen beruhende Verfahren vorgeschlagen und für die Gärprobe zwei Milchzucker-Pepton-Galle-haltige Kulturflüssigkeiten angegeben, einmal mit Zugabe von Fuchsin und zum anderen mit Zugabe von Malachitgrün. Als Farbindikator wurde Bromthymolblau verwendet.

Giudice (1934), der sich die Aufgabe gestellt hatte, einige Nährsubstrate vergleichend zu untersuchen, stellte fest, daß für den Colinachweis die beiden von Zavagli angegebenen Nährböden den anderen von ihm geprüften überlegen sind.

Forgács (1935) wendete mit gutem Erfolg den Gasbildungsnachweis in Gentianaviolett-Pepton-Galle-Milchzucker-Bouillon, ferner die Indolprobe und die Kolonienzählung auf Trypaflavinagar an.

Mit Rücksicht auf die Gefährlichkeit der Coli-Aerogenes-Bakterien für Käsereien und Molkereien weist Demeter (1929) auf die Wichtigkeit des Nachweises dieser Gasbildner hin. Er bespricht die Schwierigkeiten, die sich daraus ergaben, den Nachweis von Colibakterien mit Hilfe von festen Nährböden sicherzustellen. Die auf Endoagar rot gewachsenen Kolonien können nur dann, wenn sie nach 24stündiger Bebrütung größer als 1 mm im Durchmesser sind, zur Coli-Aerogenes-Gruppe gehörig betrachtet werden. Doch wird sich eine mikroskopische Untersuchung kaum umgehen lassen, da auch grampositive Kokken in derselben Zeit größere, rote Kolonien zu bilden imstande sind. Das Verdünnungsverfahren mittels Indolnachweis und der Gasbildung aus Lactose in flüssigen Nährböden wird für Massenuntersuchungen als äußerst zweckmäßig empfohlen, da durch diese Verfahren eine mikroskopische Prüfung umgangen werden kann. Demeter kommt zu dem Schluß, daß die Indolprobe mittels der Ehrlichschen Reaktion in der Modifikation von Kovács unter Verwendung von Kuczinskis Standard I Bouillon vierfach verdünnt am zweckmäßigsten zu bewerten ist. Zum Gasbildungsnachweis wird Gentianaviolett-Pepton-Galle-Bouillon von Keßler und Swenarton empfohlen. Die Auswertung der Ergebnisse geschah nach den von Mc. Crady vorgeschlagenen „Tabellen für rasche Beurteilung von Gärprobenresultaten“,

Lipska (1934) untersuchte 600 Milchproben, aus denen er 200 Colistämme isolieren konnte. Die Veränderlichkeit der Stämme war groß. Nach Ansicht des Verfassers sollte man sich nicht allein auf das charakteristische Wachstum der Colikolonien auf Endoager verlassen; den Unterarten und Übergangsformen der Coligruppe sollte man mehr Beachtung schenken.

Schmidt (1932) prüfte zum Nachweis der Colibakterien in der Milch die Trypaflavin-Bromthymolblau-Milchzucker-Agar-Platte, die Trypaflavin-Milchzucker-Bouillon, die Indolprobe in Neißerscher Trypsinbouillon und die Galle-Gentianaviolett-Peptonlösung. Alle vier Methoden erwiesen sich als zweckmäßig und gut.

Minkewitsch (1932) hat verschiedene, für den Nachweis der Bakterien der Coli-Aerogenes-Gruppe gebräuchliche Verfahren auf ihre Verwendbarkeit geprüft. Die von Keßler und Swenarton angegebene Gentianaviolett-Galle-Pepton-Milchzuckerlösung und deren Modifikation — Bouillonmilch Gentianaviolett — haben sich als die geeignetsten Nährböden erwiesen. Die Trypa-

flavin-Lactose-Bouillon und das Substrat Bulir, das bei der Wasseruntersuchung an erster Stelle stehen soll, bewährten sich erheblich weniger als der Gallenährboden.

Zum Nachweis von Colibakterien in Milch hatte Henneberg den besten Erfolg mit der Fuchsinbouillon nach Stern, die der Gentianaviolett-Galle-Milchzucker-Bouillon überlegen sein soll. Rochaix und Tapernaux (1933) haben die sonst für die Untersuchung des Wassers verwendete Neutralrotmethode auch bei der Untersuchung der Milch angewendet. Die Reaktion des Nährbodens besteht in einem Farbumschlag nach kanariengelb, der mit grüner Fluorescenz durchsichtig ist. Beide Erscheinungen müssen zusammen auftreten, wenn die Reaktion positiv bewertet werden soll, da manche Bakterien, wie Bact. tetani, nur Fluorescenz verursachen. Mit Vassileff kamen die beiden Verfasser zu dem Ergebnis, daß sich mit dieser Methode brauchbare Ergebnisse erzielen lassen.

Zu erwähnen sind hier noch zwei Nachweisverfahren, die auf Anreicherung von Bact. coli in der Ausgangsmilch beruhen. Pien und Bachimont hatten sich die Aufgabe gestellt, durch Begünstigung der Vermehrung des Bact. coli den Nachweis auf chemischem Wege mittels der Indolreaktion zu erbringen. Die Verfasser sind der Ansicht, daß die gewöhnliche Untersuchung von 1 ccm Milch und weniger für die Coliprobe vollkommen ungenügend ist, daß vielmehr größere Milchmengen bis zu 1 Liter Milch, welches Quantum zur Anreicherung von Colibakterien 6 Stunden bebrütet wird, erforderlich sind. Ein Teil der umfangreichen Versuche erstreckte sich auf die Prüfung, ob bei einer reichlichen Vermehrung eine direkte Artbestimmung der Colikeime durch ihre Absonderungsprodukte ermöglicht werden kann, oder ob man imstande ist, nach der sechsstündigen Anreicherung durch Überimpfen der Milch in Peptonwasser das Bact. coli eindeutig zu bestimmen. Es konnte festgestellt werden, daß das Bact. coli selbst bei Zugabe von Pepton in der Milch kein Indol bildet. Der Grund zu diesem Verhalten ist in der antagonistischen Wirkung des Milchzuckers zu suchen. Es wurde weiter gefunden, daß das Wachstum des Bact. coli bei 4 g freier Milchsäure im Liter aufhört. Ihr Untersuchungsergebnis beweist, daß bei mehr als 20 Keimen von Bact. coli in einem Liter vor der Anreicherung die Einimpfung von 1 ccm auf 10 ccm Peptonwasser nach 8 Stunden Bebrütungsdauer einen sicheren Nachweis für die Anwesenheit von Bact. coli durch die Indolreaktion liefert. Um andere indologene Keime, wie z. B. Proteus vulgaris auszuschalten, gibt man dem Peptonwasser einen 1%igen Phe-

nolgehalt. Die Indolreaktion wird mit dem Ehrlich-Kovács-Reagenz ausgeführt.

Névot gibt ein anderes Verfahren zum Nachweis der Colibakterien, das die Isolierung einzelner Stämme zum Ziele hat, an. Nach einer 6 bis 8stündigen Anreicherung der Ausgangsmilch bei 37° C wird ein Teil der Milch in Phenolpeptonbouillon verimpft und 24 Stunden bei 41,5° C in den Brutschrank gestellt. Davon wird ein Tropfen in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und dann mit einer Öse Röhrchen mit Kufferath's mineralischer Nährlösung beimpft und wieder 24 Stunden bei 41,0° C gebrütet. Endlich werden von den positiv ausgefallenen Röhrchen Agarplatten hergestellt, die der Trennung und Reinigung der zu prüfenden Bakterienkolonien dienen. Diese Reinkulturen werden auf die Indol-Neutralrot- und Bleiacetatprobe geprüft.

Diese beiden zuletzt angegebenen Verfahren sind umständlich und zeitraubend, weshalb ihnen für die Praxis keine Bedeutung zukommt.

Die vielen Nährböden, die heute für den Colinachweis in der Milch angewandt werden, und die widersprechenden Ergebnisse über die Leistungsfähigkeit dieser Nährböden lassen darauf schließen, daß die praktische Colibestimmung in der Milch bisher noch keine ganz befriedigende Lösung gefunden hat. Aus diesem Grunde erschien es angebracht, die Eignung der wichtigsten Nährböden, die uns zur Bestimmung der Colizählung zur Verfügung stehen, einer nochmaligen Prüfung zu unterziehen.

V. Fragestellung der vorliegenden Arbeit.

Die Methoden für die Prüfung der Milch auf ihren Coligehalt müssen den Forderungen, die man normalerweise für das Gelingen einer positiven Reaktion zu stellen hat, gerecht werden. Für die Praxis kann man nur solchen Verfahren das Wort sprechen, die sich auszeichnen durch Einfachheit der Handhabung, durch Schnelligkeit in der Ausführung und im Anzeigen der Reaktion, sowie durch Unabhängigkeit von dem Einfluß wechselnder Zusammensetzung der Nährböden.

Von diesen, an einen Nährboden gestellten Bedingungen ausgehend, erheben sich folgende Grundfragen:

1. Sind die mit den Agarnährböden einerseits und den flüssigen Nährböden andererseits erzielten Ergebnisse beständig?
2. In welchem zahlenmäßigen Verhältnis stehen die mit den festen und flüssigen Nährböden gewonnenen Ergebnisse

zueinander? Geben hohe Colizahlen des einen Verfahrens auch gleichzeitig große Werte des anderen?
3. Wie weit unterscheiden sich die einzelnen Nachweisverfahren voneinander? Sind etwa auftretende Unterschiede feststehend?
4. Welche der untersuchten Verfahren liefern annähernd gleiche Ergebnisse?
5. Sind die Agarnährböden den flüssigen Nährböden vorzuziehen?

Aus diesen Fragen ergibt sich die Aufgabe, die Empfindlichkeit und den praktischen Wert der angegebenen Methoden zum Nachweis des Colititers in der Milch vergleichend zu prüfen.

Nach einigen Vorversuchen wurden insgesamt in drei Versuchsreihen 125 Milchproben auf ihren Coligehalt geprüft, deren Ergebnisse in den Übersichten I bis III niedergelegt sind. Zu den Versuchen wurden Vorzugs-, Marken- und Handelsmilchen verwendet. Die wenig brauchbar befundenen Nährböden wurden im Verlauf der Versuche nicht weiter in die Versuche miteinbezogen. Übersicht III veranschaulicht die Ergebnisse, wie sie von 111 Milchproben für die bestbewährten Nährböden gefunden wurden.

VI. Eigene Versuche und ihre Auswertung.

Die ersten Versuche dienten zur Prüfung der Agarnährböden hinsichtlich ihrer Eignung zum Colinachweis. Es sollte festgestellt werden, ob und wieweit sich die eigentlich zur Unterscheidung der Bakterien aus der Paratyphusgruppe einerseits und der Coligruppe andererseits bewährten Buntplatten nach Endo, Gaßner und Conradi-Drigalski sowie die durch amtliche Bestimmung empfohlene Trypaflavinplatte nach Klimmer untereinander bewährten. In mehreren Versuchen wurden nach dem Zehntelungsverfahren Aufschwemmungen von Colireinkulturen in abgekochter Milch und steriler physiologischer Kochsalzlösung in Verdünnungen bis zu $^1/_{10\,000\,000}$ angelegt und jeweils 0,1 ccm davon auf den Agarnährboden ausgespatelt. Erhebliche Unterschiede hinsichtlich des Wachstums und der Anzahl der Kulturen konnten nicht beobachtet werden. Im großen und ganzen waren die vier Nährböden, was den Nachweis der Reinkulturen von Coli betrifft, einander ziemlich gleichwertig.

Nachdem in etwa 10 Vergleichsversuchen nachgewiesen war, das die Agarnährböden mit Reinkulturen einander ebenbürtig

waren, wurde daran gegangen, in drei Versuchsreihen mit 125 Milchproben (Versuche 1—41, 42—100 und 101—125) die festen und flüssigen Nährböden nebeneinander auf ihre Leistungsfähigkeit unter praktischen Bedingungen, d. h. auf ihre Eignung zum Colinachweis in Gegenwart von grampositiven Milchsäurebakterien, zu prüfen.

Zunächst sollen die mittels der Agarnährböden gefundenen Ergebnisse einer Besprechung unterzogen werden. Im Verlauf der Versuche zeigte es sich bald, daß von den drei Buntplatten, in Beziehung gebracht zu dem Trypaflavinagar, die Endoplatte für die Milchbakteriologie die interessanteren Feststellungen bot. Charakteristisch für die Colikolonien auf dem Endoagar ist der metallisch kupferne Glanz. Kolonien dieser Art vermögen nur typische Colibakterien zu bilden. Der Erkennung der Endoplattenkolonien stellten sich oft Schwierigkeiten entgegen. Was ihre Größe und Wachstumsfreudigkeit, Art und Farbenunterschied anbelangt, konnten die bekannten, mannigfaltigen Formen auf diesem Nährboden selbst aus einer Milchprobe beobachtet werden, deren genaue Arterkennung nicht selten erst durch Bestimmungsnährböden[1] (sogenannte kleine bunte Reihe) ermöglicht werden konnte.

Hielt sich die Gesamtzahl der Kulturen auf den festen Nährböden in niedrigen Grenzen, so stellten sich gewöhnlich bei der Erkennung der Kolonien typischer Coliarten keine größeren Schwierigkeiten entgegen. Sobald aber die Agarplatten mit einer größeren Anzahl Kolonien besiedelt waren, wurde ihre Erkennung aus der Menge der vielgestaltigen Kolonienformen sehr erschwert, oft sogar unmöglich gemacht. Bei sehr dicht mit Säurebildnern bewachsenen Platten wurde eine so starke Ausbreitung des roten Farbstoffes der Endoplatte in die Umgebung der Säurebildner beobachtet, daß selbst vereinzelte, zwischen den Säurebildnern wachsende Colikolonien gelegentlich übersehen wurden.

Es blieb dann nichts anderes übrig, als sich mit einer Schätzung zufrieden zu geben.

Häufig konnte das Vorkommen kleiner und kleinster Kolonien, die sich oft als sehr störend erwiesen, beobachtet werden; sie wurden in der Regel von Streptokokken gebildet. Diese auf mit Milch beimpften Agarnährböden vorkommenden nadelspitz-

1. Zur Artbestimmung der Colistämme auf ihr biochemisches Verhalten wurden folgende Bestimmungsnährböden benutzt: 1. Milchzucker-, 2. Sacharose-, 3. Mannit-, 4. Dulzitnährboden, 5 Trypsinbouillon für die Indolprobe (Herstellung s. bei R. Standfuß: Bakt. Fleischbeschau, 3. Aufl. S. 146—147).

feinen Kolonien, von den Amerikanern „pint point colonies" genannt, sind häufig beobachtet und beschrieben worden.

Im folgenden sollen einige merkwürdige Beobachtungen berichtet werden, die das kulturelle Verhalten einiger Colistämme auf dem Endoagar betreffen:

Wiederholt konnte auf Endoagar das Auftreten zahlreicher, farbloser, etwa 1 mm im Durchmesser großer Kulturen beobachtet werden. War der Nährboden nicht zu dicht besiedelt, so kam ihre rote, stark kupfern glänzende Farbe noch schön heraus, wenn die Kolonien vom zweiten Tage an bei Zimmerwärme gehalten wurden. Dagegen konnten auf den zugehörigen Gaßner-, Conradi-Drigalski- und Trypaflavinplatten entweder gar keine oder nur vereinzelte Kulturen festgestellt werden. Es konnte vorkommen, daß die Anzahl von Colikolonien auf dem Endonährboden um das Zehnfache höher war als die auf den übrigen Agarplatten. In diesen Fällen konnten jedesmal einwandfrei durch Bestimmung in bunter Reihe echte Colistämme ermittelt werden. Es ergab sich also eine Bestätigung der bekannten Tatsache, daß atypische Colibakterien ein und desselben Stammes auf Endoagar ohne große Schwierigkeiten zu wachsen fähig waren, während der Trypaflavinnährboden ihnen keine Entwicklungsmöglichkeit gewähren konnte.

Nicht selten konnten auch solche Colirassen beobachtet werden, die auf dem Trypaflavinnährboden offenbar nur unter den größten Schwierigkeiten Kulturen zu bilden imstande waren. Nach der eintägigen Bebrütungszeit konnten auf diesem Agarnährboden keine, auf den zugehörigen Buntplatten zahlreiche Colikolonien festgestellt werden. Drei bis fünf Tage nach der Verimpfung der Milch entwickelten sich dann allerdings auch auf der Trypaflavinplatte typische Colikolonien. Ohne Anwendung eines Vergleichsverfahrens hätte man nach der Bebrütungsdauer von 24 Stunden die Versuchsmilch für colifrei erklären müssen.

Zu anderen Malen wurden auf dem Fuchsinagar nach Endo neben ausgesprochen für Coli charakteristisch wachsenden Kolonien auch solche beobachtet, die sich kulturell ähnlich verhielten wie die eben besprochenen. Auffallend war wiederum die Tatsache, daß erst am dritten Tage, noch deutlicher am vierten, nach der Verimpfung der Endoagar stark gerötet wurde und die anfangs hellroten Kolonien doch noch einen metallisch kupfernen Glanz erhielten. Die Identifizierung dieser Kulturen, die von echten Colikulturen nicht zu unterscheiden waren, ergab, daß sie von gramfesten, nicht näher bestimmten Milchsäurelangstäbchen gebildet wurden. Zur Prüfung ihres kultu-

rellen Verhaltens wurden diese Keimarten, von der Originalplatte ausgehend, auf die eine Hälfte neuer Platten und zum Vergleich auf die andere ein erprobter, charakteristisch wachsender Colistamm verimpft. Es zeigte sich, daß der Endoagar den milchsäuernden, gramfesten Stäbchen eine gute Entwicklungsmöglichkeit bot. Gaßner- und Conradi-Drigalskiagar ließen nur eine bedingte Entwicklung dieser Keime zu. Die Trypaflavinplatte schaltete ihr Wachstum fast immer aus. Mithin war es auf dem Endoagar nicht immer möglich, Kolonien normaler Colibakterien von denen anderer, überhaupt nicht zu der Coligruppe gehörender Keime kulturell zu unterscheiden, weshalb der Wert dieses Nährbodens für die praktische Diagnostik sehr an Bedeutung verliert. Der Trypaflavinagar ließ nur Bakterien echter Colirassen zur Entwicklung kommen; es wurde aber gelegentlich bemerkt, daß dieser Nährboden das Wachstum einiger Colistämme vollkommen unterdrückte. Die Endoplatte wirkte wenig selektiv und vermochte viele Mikroorganismen, die zufällig auch Milchzucker zersetzten, in ihrem Wachstum nicht zu hemmen. Aus diesem Grunde sind wohl auch bis zu einem gewissen Grade die verhältnismäßig großen Unterschiede der Plattenergebnisse zu erklären.

Wie aus Übersicht III zu ersehen ist, gab die Endoplatte, auf alle Versuche berechnet und mit jedem Nachweisverfahren verglichen, die weitaus höchsten Werte. Von den festen Nährböden lieferte die Klimmersche Trypaflavinplatte die niedrigsten Ergebnisse. Der auf Endoagar ermittelte Durchschnittswert von 111 Milchproben, berechnet auf die Anzahl der Colikulturen in 0,1 ccm Milch, wobei nur echte Colikolonien gezählt wurden, war um 1,58 mal größer als die auf der Trypaflavinplatte gewonnenen Werte.

Während nun die Ergebnisse der Colizahlen bei den festen Nährböden erheblich voneinander abweichen, ist dies bei den flüssigen Nährböden nicht so sehr der Fall. Wenn sich auch die einen Nährflüssigkeiten für die Coliprobe wenig bewährten, so ließen sich mit den anderen durchaus brauchbare Resultate erzielen.

Als eine wichtige Aufgabe ergab sich die Notwendigkeit, die Eignung der farbstoffhaltigen Kulturflüssigkeiten im Vergleich mit der als vollbewährt geltenden Milchzuckerbouillon zu untersuchen. Wie aus den Ergebnissen aus drei Versuchsreihen hervorgeht (Übersicht I bis III), haben sich die Gallenährböden mit Gasbildungsnachweis aus Milchzucker am geeignetsten für die Colizählung in der Milch erwiesen. Durch ihre Farbstoffzu-

sätze trat mit Ausnahme der Galle-Bromthymolblau-Malachitgrünbouillon nach Zavagli keine wesentliche Hemmung der gramnegativen Keimarten ein, wie die Ergebnisse mit Galle-Milchzuckerbouillon[1], die zu einer Reihe von Versuchen vergleichsweise miteinbegriffen wurde, gezeigt haben. Die Milchzucker-Galle-Bromthymolblau-Malachitgrünbouillon konnte ihre Probe hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit auf Colibakterien nicht bestehen, da diese Nährflüssigkeit Coli in seinem Wachstum hemmte und nur unter erschwerten Bedingungen zur Entwicklung kommen ließ. Die Milchzucker-Galle-Bromthymolblau-Fuchsin-Bouillon von Zavagli erwies sich als der empfindlichste aller flüssigen Nährböden. Neben dem Vorteil, mit bemerkenswerter Regelmäßigkeit Gas zu entwickeln, hat diese Nährbouillon noch den weiteren Vorzug, bei Anwesenheit von Colibakterien deren Säuerung durch einen Farbumschlag von grün in ein intensives Rot anzuzeigen. Allerdings wurde oft genug eine rote Färbung durch säuernde, gramfeste Keime bemerkt. Gewöhnlich konnte aber diese nicht die ganze Kulturflüssigkeit erfassende Rötung von der durch Colibakterien hervorgerufenen kräftig roten Fuchsinfarbe unterschieden werden. Nach den Ergebnissen aller Versuche (Übersicht II) ist im großen und ganzen die Galle-Bromthymolblau-Fuchsin-Bouillon von Zavagli der Gentianaviolett-Galle-Bouillon von Keßler und Swenarton vorzuziehen. Aber auch der letztgenannte Nährboden erwies sich empfindlich gegenug, brauchbare Ergebnisse zu liefern. In dieser Beziehung ließ die Trypaflavinbouillon nach Klimmer zu wünschen übrig. Es zeigte sich, daß dieses Nährsubstrat nicht selten um einen Verdünnungsgrad weniger Gas anzeigte als die Gallenährböden, Als ein großer Nachteil mußte gerade ihr Versagen hinsichtlich des Gasnachweises bei Vorhandensein nur weniger Colibakterien empfunden werden.

Die in der angegebenen Zusammensetzung nach dem Vorbild der Fuchsinbouillon nach Stern verwendete Fuchsinbouillon hat sich zum Colinachweis in der Milch als gänzlich ungeeignet erwiesen. Es mußte ihr jede auslesende Fähigkeit abgesprochen werden, da auch grampositive Begleitbakterien in ihr gut wachsen konnten und die durch deren Säuerung bedingte Rötung des Nährbodens das Vorhandensein von Colikeimen vortäuschen konnten. Die erzielten hohen Werte (Übersicht I) standen in keinem Verhältnis zu dem der übrigen Nachweisverfahren. Es

1. Zusammensetzung der Galle-Milchzuckerbouillon wie die Stammlösung der Bouillon nach Zavagli ohne Farbstoffzusätze.

konnten aus den positiven Röhrchen der höheren Verdünnungen keine gramnegativen Stäbchen isoliert werden, sondern nur gramfeste Milchsäurestäbchen, zuweilen auch Milchsäurestreptokokken.

Wie aus den Ergebnissen der drei Versuchsreihen hervorging, stand mit der Indolprobe in Trypsinbouillon (Übersicht I—III) immerhin ein recht brauchbares Verfahren zum Nachweis von Bact. coli in der Milch zur Verfügung. Allerdings hat dieses Verfahren einen Nachteil, da es nur die typischen indologenen Coliarten zu erfassen vermochte. Von 125 untersuchten Milchproben konnte in 8 Fällen Bact. coli anindolicum in bunter Reihe ermittelt werden, d. h. in 6,4% aller Milchproben blieb eine positive Reaktion aus. Noch eine andere, nicht für den Indolnachweis sprechende Beobachtung, auf die schon Demeter hingewiesen hat, konnte gemacht werden. Wurde die Trypsinbouillon mit 1 ccm der Versuchsmilch beschickt, so kam es in den meisten Fällen vor, daß die positive Reaktion ausblieb, obwohl die Röhrchen der höheren Verdünnungsgrade deutlich positiv waren, während bei den farbstoffhaltigen Gallenährböden, mit der gleichen Milchmenge beschickt, immer noch Gasbildung bei Anwesenheit von Bact. coli auftrat. Dasselbe Verhalten konnte für die Milchzuckerbouillon, die Galle-Milchzuckerbouillon und für die zu einigen Versuchen miteinbezogene Stierhodenbouillon nach Hottinger festgestellt werden. Offenbar bringen die aus dem Zucker gebildeten Säuren das Bakterienwachstum zum Stillstand. Aus den fraglichen Reagenzröhrchen wurde Bact. coli im gefärbten Ausstrich und durch Ausspateln der Milch auf Buntplatten nicht ermittelt, dafür regelmäßig gramfeste Keimarten aus der Milchflora. Durch eingehende Versuche über den Einfluß, der von durch Milchsäure gesäuerte Milch auf das Bakterienwachstum ausgeübt wird, konnten Mosse und Happe (1934) feststellen, daß das Bact. coli durch die üblichen Milchsäuremilchmischungen in seiner Entwicklung völlig unterdrückt wird. Bei den Sporenbildnern war die Wachstumshemmung deutlich, doch nicht so stark wie bei den Keimen der Colirassen. Bact. lactis aerogenes wurde durch Säurezusatz nur unwesentlich beeinflußt. Den Versuchen mit Reinkulturen standen Versuche mit Spontanbeimpfung der Milch gegenüber, die zeigten, daß bei einem pH-Wert von 3,2 Keimfreiheit der Milch erreicht wurde. Scheer fand, daß ein pH-Wert von 4,6 ausreicht, Colibakterien in der Milch abzutöten.

Was die Beurteilung des Neutralrotagars betrifft, so hatte sich dieses Verfahren, den Nachweis von Colibakterien auch in der Milch sicherzustellen, als eines der brauchbarsten aller in dieser

Arbeit angewandten Methoden erwiesen. Meistens schon nach 20—24 Stunden machte sich Colivorkommen durch eine Gasbildung und Verfärbung des Nährbodens bemerkbar. Nach 48 Stunden war der Nachweis immer beendet. Als ein beachtlicher Vorzug muß die große Regelmäßigkeit, mit der dieser Nährboden die Anwesenheit von Coli anzeigte, genannt werden.

Wie verhalten sich nun die Durchschnittswerte der Agarnährböden zahlenmäßig zu denen der flüssigen Nährböden? Offenbar lassen die Durchschnittswerte, wie sie in den Übersichten I bis III festgelegt sind, erhebliche Schwankungen erkennen. Die Durchschnittswerte der Agarnährböden von einer Milchprobe, aus 0,1 ccm Milch berechnet, sind um 2,21 mal größer als die der flüssigen Nährböden. Diese Schwankungsweite ist mit geringer Verschiebung für alle Versuchsreihen feststehend. Es ist aber zu berücksichtigen, daß bei der Errechnung der Durchschnittswerte für die flüssigen Nährböden einschließlich Neutralrotagar nur die niedrigste Anzahl von Colibakterien, die überhaupt eine positive Reaktion auslösen konnte, angenommen wurde. Wenn z. B. auf jedem der festen Nährböden aus 0,1 ccm Milch im Durchschnitt fünf Colibakterien gezählt wurden, so wurde für jeden flüssigen Nährboden bei positiver Reaktion nur ein Colibakterium angenommen, obwohl es nach theoretischer Überlegung ein bis zehn Colikeime sein konnten. Dieser Rechenfehler kann bis zu einem gewissen Grade die Schwankungen der Durchschnittswerte zwischen den festen Nährböden einerseits und den flüssigen Nährböden andererseits erklären. Wie aus Übersicht III hervorgeht, lassen die Durchschnittswerte des Trypaflavinnährbodens und der Milchzucker-Bromthymolblau-Fuchsin-Galle-Bouillon, welche Nährmedien als die bewährtesten von den festen einerseits und den flüssigen Nährböden andererseits anzusehen sind, keine allzu großen Unterschiede erkennen. Diese auf errechnetem Wege gewonnene Feststellung fand auch während der praktischen Ausführung der Versuche ihre Bestätigung insofern, als die für die Trypaflavinplatte ausgezählten Kulturen mit der Gasbildung in Milchzucker-Galle-Bromthymolblau-Fuchsin-Bouillon in einem genauen Verhältnis standen, d. h. Gasbildung in diesem Gallenährboden konnte bei Verimpfung von 0,1 ccm der Versuchsmilch mit einiger Regelmäßigkeit dann beobachtet werden, wenn eine bis zehn Colikolonien auch auf Trypaflavinager gezählt, Gasbildung bei Verimpfung von 0,01 ccm, wenn zehn bis hundert Colikolonien festgestellt wurden.

Die im Durchschnitt errechneten Ergebnisse auf eine Milchprobe mit ein bis zehn und solcher mit zehn und mehr Coli-

keimen, bezogen auf das Zahlenverhältnis der festen zu den flüssigen Nährböden, ergaben folgende Feststellungen:

Der Durchschnittswert der Colibakterien der flüssigen Nährböden war bei 57 Milchproben mit mehr als zehn Colibakterien um 2,43 mal kleiner als der der festen Nährböden, während das Durchschnittsergebnis für Coli von 54 Milchproben mit weniger als zehn Colibakterien nur um 1,99 mal kleinrr war. Die Ausschlagsbreite der Durchschnittswerte der 57 z. T. stark colihaltigen Milchproben von Platten und flüssigen Nährböden mußte größer sein als bei allen Milchproben insgesamt genommen. Bei Anwesenheit von nur wenigen Colibakterien in 0,1 ccm Milch stimmten, wie aus Übersicht V hervorgeht, die für die dort genannten Nährböden gefundenen Durchschnittswerte mit Ausnahme des Fuchsinagar nach Endo im wesentlichen überein. Die Schwankungsweite der festen Nährböden zu den Kulturflüssigkeiten um etwa das Doppelte ist durch die hohen, aber keineswegs verläßlichen Werte der auf der Endoplatte gezählten Kolonien zu erklären. Die Frage, ob die festen Nährböden den flüssigen vorzuziehen sind, mußte auf Grund der Versuchsergebnisse zu Ungunsten der Agarnährböden entschieden werden. Nur bei Anstellung einer sehr großen, in der Praxis kaum zu leistenden Anzahl von Einzelversuchen würde die Colikeimzählung in einer wirklich korrekten Anwendungsweise auf große Genauigkeit rechnen können. Da es aber praktisch vollkommen genügt, die ungefähre Colizahl einer Milch zu ermitteln, sind die flüssigen Nährböden mit Gasnachweis den Plattenverfahren vorzuzuziehen, weil diese einen der oft mühevollen Nachuntersuchungen entheben und beide Verfahren letzten Endes den Anspruch größter Genauigkeit nicht erheben können. Außerdem gaben hohe Colizahlen, mit den Plattenmethoden ermittelt, praktisch die gleichen Werte mit den empfindlichsten Verdünnungsverfahren.

Die flüssigen Nährböden haben gegenüber den Plattenmethoden noch einen anderen Vorteil. Bei den flüssigen Nährböden war die Einbringung weitaus größerer Milchmengen möglich, wo sie in der Regel bei Agarnährböden auf 0,1 ccm beschränkt war. Mit Hilfe der flüssigen Nährböden würde eine Keimzählung immer noch dann durchführbar sein, wenn eine Coliaufschwemmung in der Milch so wenig dicht wäre, daß erst in einer größeren Menge auf das Vorkommen einzelner Bakterien aus der Coligruppe gerechnet werden könnte. Die Plattenkulturen konnten dazu führen, bei einer Verimpfung von 0,1 ccm Milch diese für colifrei zu bezeichnen, während bei einer verimpften

Menge von 1 ccm Milch in die flüssigen Nährböden nicht selten noch Colivorkommen ermittelt werden konnte.

VII. Zusammenfassung.

1. Unter den festen Nährböden hat sich der Milchzucker-Bromthymolblau-Trypaflavinagar nach Klimmer als das bestgeeignete Plattenverfahren zum Nachweis von Colibakterien in der Milch erwiesen, wenn sich auch mit diesem Nährboden ein optimales Wachstum aller Bakterien aus der Coligruppe nicht erreichen ließ. Die störenden grampositiven Begleitbakterien der Milch wurden unterdrückt, während eine wesentliche Hemmung echter Colibakterien nicht eintrat. Im Verlaufe der Versuche wurde gelegentlich beobachtet, daß einige Colistämme auf diesem Nährboden zu keiner Entwicklung kommen konnten.

2. Als wesentlicher Nachteil der Buntplatten nach Endo, Gaßner und Conradi-Drigalski mußte die ungehemmte Entwicklung von gramfesten Säurebildnern angesprochen werden, deren Kolonien besonders auf dem Endoagar durch coliähnliches Wachstum von den Kulturen echter Colibakterien nicht immer unterschieden werden konnten. Auf die Unterscheidung des typischen fäkalen Bact. coli von grampositiven Milchsäurebildnern mußte sorgfältig Bedacht genommen werden.

3. Als beste Kulturflüssigkeit zum Gasbildungsnachweis aus Milchzucker erwies sich die von Zavagli angegebene Milchzucker-Galle-Pepton-Bromthymolblau-Fuchsin-Bouillon. Auch die Milchzucker-Galle-Pepton-Gentianaviolett-Bouillon nach Keßler und Swenarton war empfindlich genug, brauchbare Ergebnisse zu liefern. Die Trypaflavinbouillon nach Klimmer und die Milchzucker-Galle-Pepton-Malachitgrün-Bouillon von Zavagli bewährten sich erheblich weniger, da beide Nährböden Coli nur unter erschwerten Bedingungen zur Entwicklung kommen ließen.

4. Der nach dem Vorbild der Sternschen Fuchsinbouillon verwendete Milchzucker-Fuchsinnährboden, der sich nur auf die Beobachtung der Säuerung gründete mit Unterlassung der Gasbildung, hat sich zum Colinachweis in der Milch als unbrauchbar erwiesen.

5. Die Milchzuckerbouillon, die keine Substanzen enthielt, die die allzustarke Wachstumsfreudigkeit der grampositiven Milchflora verhinderten, hat sich nicht bewährt.

6. Die Indolprobe konnte als eine wertvolle Ergänzung zum Colinachweis in der Milch angewandt werden.

7. Die Prüfung der Milch auf ihren Coligehalt mit Hilfe des Neutralrotagars hat sich als sehr nützlich und brauchbar erwiesen. Das Verfahren arbeitete sicher und genau.

8. Die flüssigen Nährmedien und der Neutralrotagar ergaben niedrigere Durchschnittswerte als die Plattenmethoden, was bis zu einem gewissen Grade auf die Berechnung der Durchschnittswerte zurückzuführen ist. Mit Fuchsinagar nach Endo wurden die höchsten Keimzahlen erzielt. Die für Trypaflavinagar ermittelten Durchschnittswerte kamen den Ergebnissen der flüssigen Nährböden am nächsten.

9. Der Coligehalt einer Milch konnte durch keines der angegebenen Verfahren mit unbedingter Genauigkeit, sondern meistens mit Schwankungen in ziemlich erheblichen Grenzen bestimmt werden.

10. Um diese Schwankungen nach Möglichkeit auszugleichen, empfiehlt sich die gleichzeitige Anwendung mehrerer Nachweisverfahren. Als die besten Nährböden werden die Milchzucker-Galle-Pepton-Bromthymolblau-Fuchsinbouillon von Zavagli, der Neutralrotagar und die Milchzucker-Bromthymolblau-Trypaflavinplatte nach Klimmer für die praktische Colibestimmung in der Milch empfohlen.

Zum Schlusse meiner Ausführungen ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. Richard Standfuß für die Überlassung der Arbeit und die mir dabei zuteil gewordene Hilfe zu danken.

VIII. Schrifttumverzeichnis.

1. Demeter, K. J.: Der Nachweis der Coli-Aerogenes-Gruppe in Milch. Milchw. Zblatt *58*, 261—298 (1929).
2. Demeter, Sauer, Miller: Vergleichende Untersuchungen über verschiedene Methoden zur Coli-Aerogenes-Titerbestimmung in Milch. Milchwirtsch. Forsch. *15*, 265—280 (1933).
3. Fleischmann-Weigmann: Lehrbuch der Milchwirtschaft, 7. Aufl. S. 471—473 (1932).
4. Keßler, M. A. u. Jos. C. Swenarton: Gentianaviolet lactose pepton bile for the detection of Bacterium coli in milk. Jahresber. Vet.-Med. *1927 II*, 1238.
5. Klimmer: Milchkunde, 2. Aufl. S. 146—150.
6. Klimmer, Haupt, Borchers: Über das Vorkommen und die Bestimmung der Coli- und Aerogenesbakterien in der Milch. Milchw. Forsch. *9*, 236—248 (1930).
7. Minkewitsch, J. E.: Zur Bestimmung des Coliaerogenestiter in Milch. Zbl. f. Bakt. *125*, 126—127 (1932).
8. Nißle: Die Colibakterien und ihre pathogene Bedeutung. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen *VI, 1* 415—443 (1929).
9. Rievel, Handbuch der Milchkunde, 3. Aufl.
10. Spitta: Die bakteriologische Untersuchung des Wassers und des Abwassers. Handbuch der pathog. Mikro, 3. Aufl., 511 (1929).
11. Standfuß: Bakteriologische Fleischbeschau, 3. Aufl. (1936).
12. Zavagli, Vittorio: Zum Vorkommen und zur Bedeutung der Coli-aerogenes Keime in der Milch. Z. Inf. Krkh. Haustiere, *45*, 110—134 (1933).

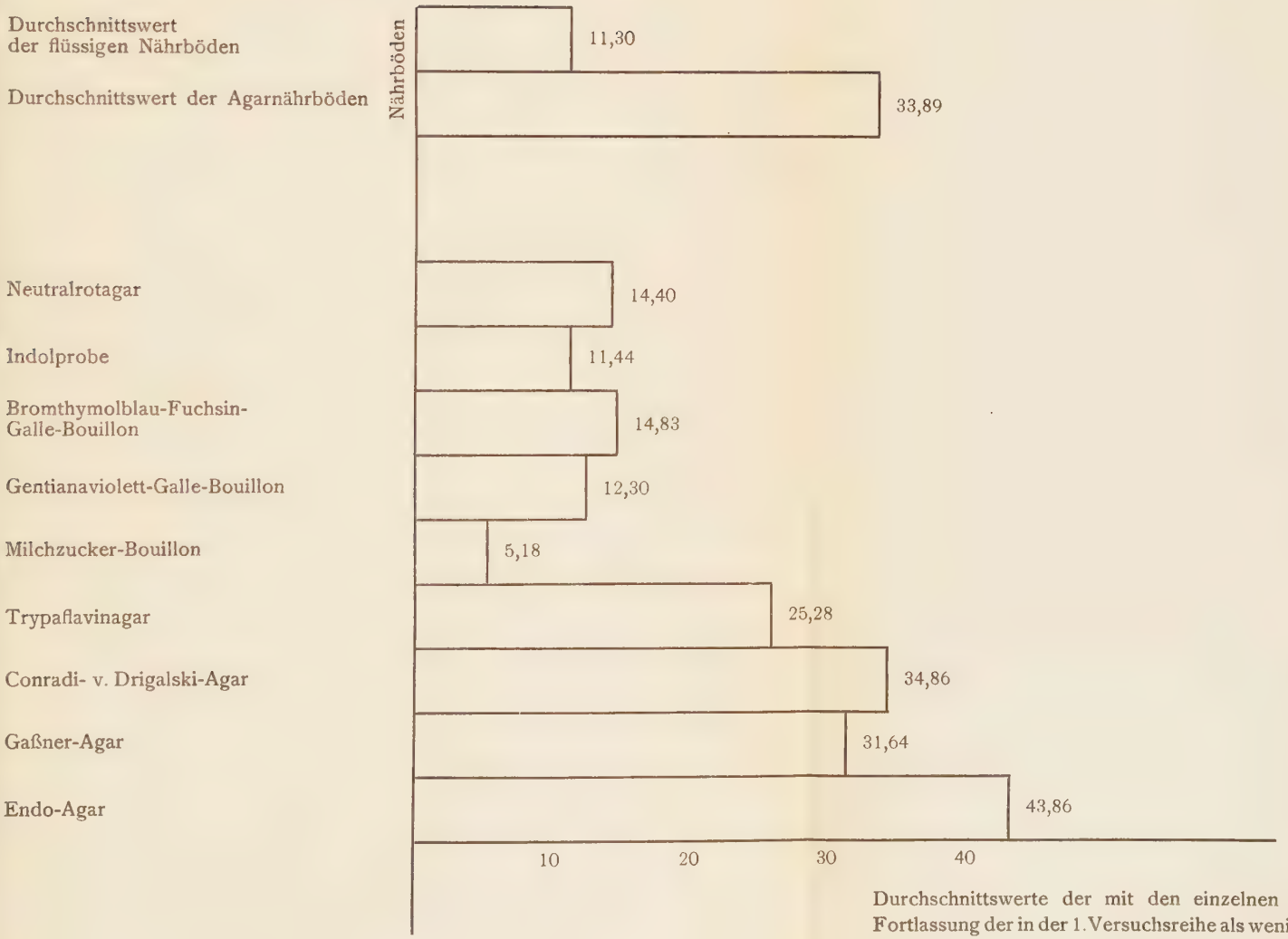
Übersicht I.

Versuchsreihe A.

Durchschnittswerte der mit den einzelnen Nährböden ermittelten bezw. scheinbar ermittelten Colibakterien in 0,1 ccm auf 41 Versuche berechnet.

Übersicht II.

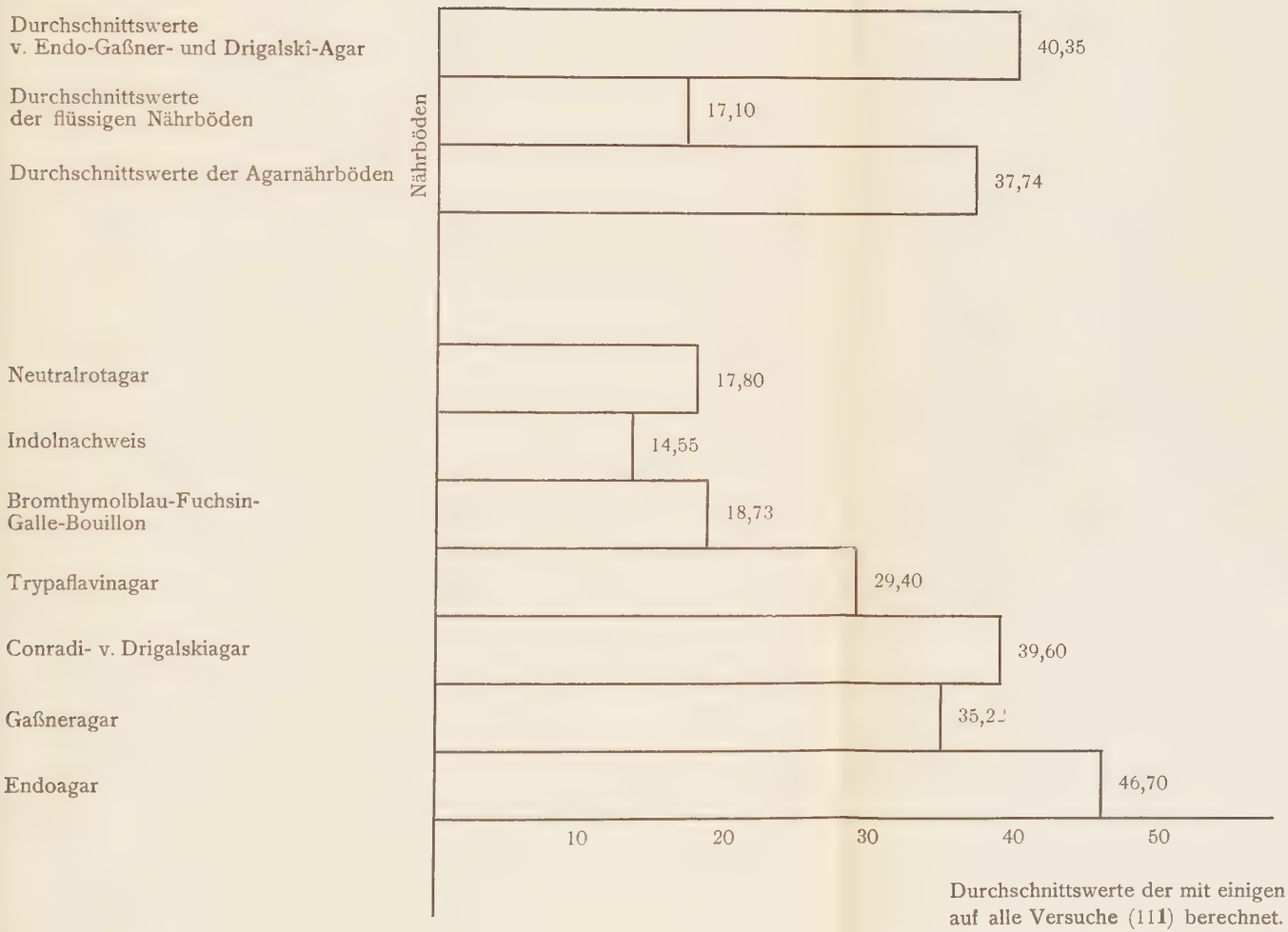
Versuchsreihe B.



Durchschnittswerte der mit den einzelnen Nachweisverfahren unter Fortlassung der in der 1. Versuchsreihe als weniger brauchbar befundenen Nährböden ermittelten Colibakterien, auf 59 Versuche berechnet.

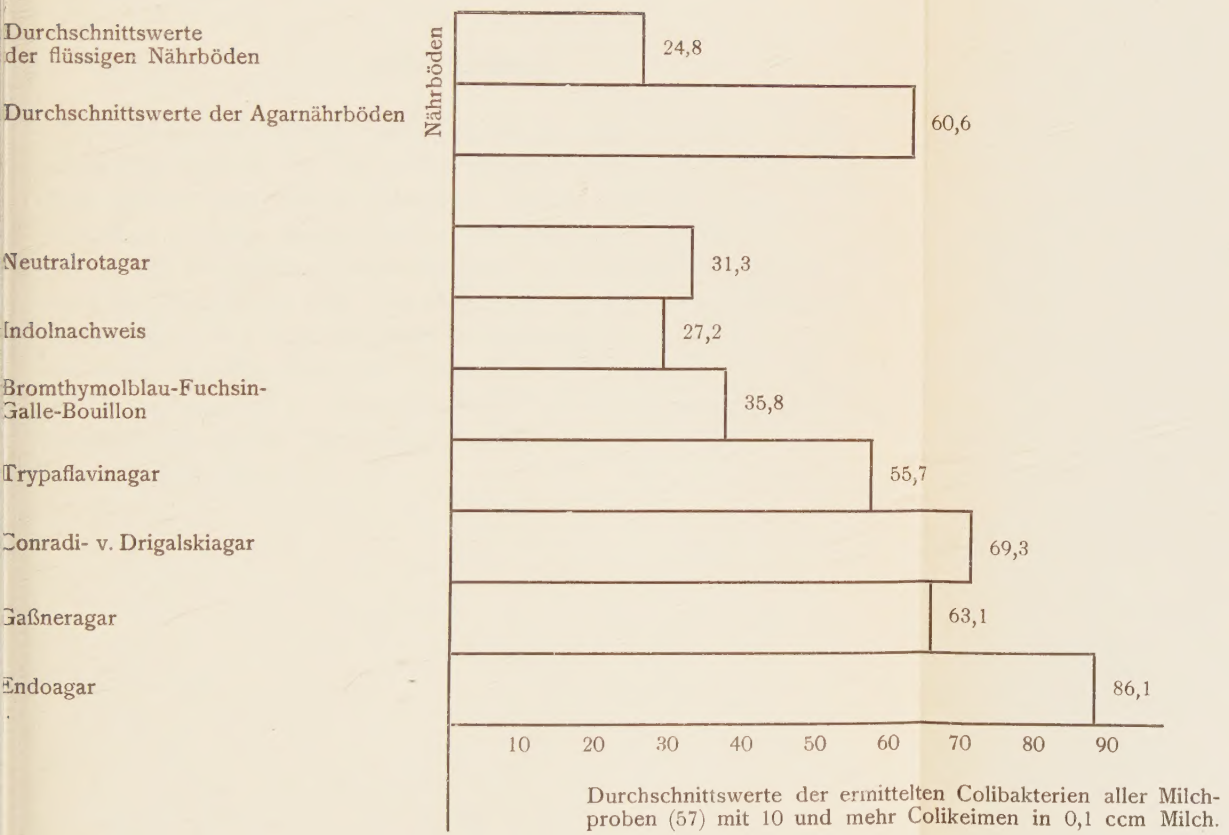
Übersicht III.

Versuchsreihe C.



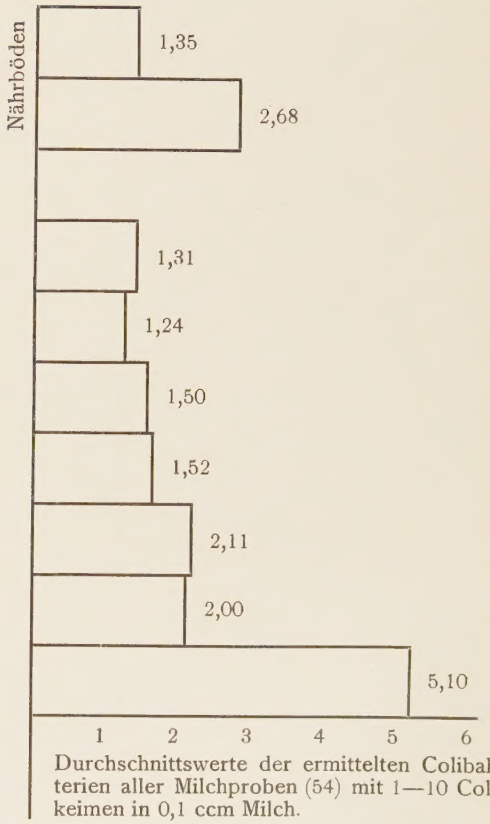
Durchschnittswerte der mit einigen Nährböden ermittelten Colizahl, auf alle Versuche (111) berechnet.

Übersicht IV.



Durchschnittswerte der ermittelten Colibakterien aller Milchproben (57) mit 10 und mehr Colikeimen in 0,1 ccm Milch.

Übersicht V.



Durchschnittswerte der ermittelten Colibakterien aller Milchproben (54) mit 1—10 Colikeimen in 0,1 ccm Milch.

Lebenslauf.

Ich, Harald Holtz, wurde am 11. April 1910 zu Osona (Südwest-Afrika) als Sohn des Gustav Holtz und seiner Ehefrau Marta, geb. Gerth, geboren. Vom 6. bis 10. Lebensjahre besuchte ich das „Conradinum" in Danzig-Langfuhr. 1921 trat ich in die Deutsche Oberrealschule in Windhuk ein und legte dort im November 1930 die Reifeprüfung ab. Vom Sommersemester 1931 bis einschließlich Wintersemester 1935/36 widmete ich mich dem Studium der Veterinärmedizin an der Universität in Leipzig und der Landesuniversität zu Gießen. Am 20. Juni 1936 bestand ich an der Landesuniversität zu Gießen das Tierärztliche Staatsexamen.